

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791560

研究課題名(和文)

口唇口蓋裂の最新遺伝子解析研究

研究課題名(英文)

Recent genetics of Cleft Lip and Palate

研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：30468996

研究成果の概要(和文)：

口唇口蓋裂は外表先天異常の中で最も高頻度で現れる多因子遺伝疾患であり、以前より数多くの原因遺伝子が報告されてきた。今回の研究によって BMP4 遺伝子の変異が微小型の口唇裂 (Microform Cleft lip) と口唇口蓋裂の原因であることを発見した。近年、口唇口蓋裂の原因の一つである IRF6 遺伝子の解析において、IRF6 遺伝子発現の調節領域である TFAP2 遺伝子結合部位の遺伝子多型変化が口唇裂発生に深く関与していることが示唆された。また TFAP2 遺伝子そのものも連鎖解析において疾患関連遺伝子として報告されている。8カ所の TFAP2 遺伝子多型解析には TDT 解析である FBAT を使用した。解析結果において、TFAP2 遺伝子内部の多型 (rs1675414) が有意差 (P 値<0.001) ありと判定された。2010 年の大規模な全ゲノム遺伝子解析において、MAFB、VAX1、PAX7 等の幾つかの遺伝子座が新たに口唇口蓋裂の候補遺伝子領域として報告されており、特に VAX1,MAFB が口唇口蓋裂に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P), a common birth defect, is a complex trait, arising from the influence of genetic and environmental factors. There are many studies have been reported. Our study supports the role of BMP4 in nonsyndromic CL/P, with mutations in BMP4 associated with microforms and OO, and polymorphic variants increasing the susceptibility to overt CL/P.

A recent study of variants in the IRF6 gene showed variants in an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. We have also previously reported the linkage of NS CL/P to the 6p23 region that contains TFAP2A gene. We genotyped 8 SNPs in and near TFAP2A and FBAT was used for transmission disequilibrium test. A statistically significant association between CL/P and TFAP2A ($p < 0.001$) was shown for rs1675414. These results support a direct role for variation of TFAP2A in orofacial clefting and suggests that examination of additional members of this pathway and deeper investigation of SNPs at the TFAP2A locus may disclose etiologic variants. Also recent Genome wide associations study discovered multiple loci such as MAFB, VAX1 and PAX7. We genotyped single nucleotide polymorphisms (SNPs) in or near VAX1, MAFB and PAX7. Results showed strong association between these genes and cleft lip and palate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口唇裂、口蓋裂、口唇口蓋裂、TGFB 遺伝子、BMP 4 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトゲノム解析研究を含む分子生物学研究が急速に発達し、いくつかの候補遺伝子が報告されている。口唇口蓋裂は先天異常の中でも最も高い発現頻度で見られる外表奇形であるが、その発現頻度は 0.015%であり、ましてや口唇口蓋裂を伴う症候群の場合、症例数が少ないため 1 施設でこれを行うことは困難である。原因論としては多因子遺伝疾患のモデルが用いられることが多いが、地域または人種により発現頻度が異なることは古くから知られている。現在では数多くの原因遺伝子が報告され、実験動物モデルにおいても knock out マウスを作成する事により、遺伝子の機能と口唇口蓋裂との関わりが明らかにされつつある。なかでも口唇口蓋裂の発現に深く関わっていると考えられる遺伝子の中で、TGFB super family の存在は非常に興味深いと考えられる。また米国 Iowa 大学の Jeffrey.C.Murray らは幾つかの遺伝子が口唇口蓋裂の発現の 10-15% を占めると報告している。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂は先天異常の中でも最も高い発現頻度で見られる外表先天異常であり、その発現頻度は 0.015%である。発生頻度において、地域または人種により発現頻度が異なることは古くから知られており、また家系内発現のパターンも異なっている。現在において、世界中の研究機関から報告があるが、未だ解明には至っていない。今回我々は日本人と遺伝的に類似点の多いモンゴル人の口唇口蓋裂ならびにそれに関連する症状群について病因を解析する。私は口腔先天異常の遺伝子解析で WHO のこの分野の責任者であるアイオワ大学の Jeffrey.C.Murray 教授と共同研究を 6 年間にわたりアイオワ大学の研究室で研究を行ってきた。本申請では日本人と遺伝的に類似点の多いモンゴル人の口唇口蓋裂ならびにそれに関連する症状群について病因を解析し、多人種間での比較を行うことにより、人類共通の原因遺伝子と人種に

よる原因遺伝子の違いを解明し、人類の口腔先天性疾患の克服のための基礎的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではすでに倫理委員会の承認を得ており、遺伝子試料の収集を開始している。試料は文部科学省ハイテクリサーチ拠点補助金で設置した匿名化システム、大型超低温フリーザー、特注遺伝子試料保管庫に指紋認証システム、自動発電装置保管施設など配した口腔先天疾患関連遺伝子共同研究機構の遺伝子試料保管室（バンキングセンター）にて、患者のプライバシーに十分留意するとともに安全に保管している。

ヒトゲノム解析研究が急速に進展しており、International Hapmap project はじめ、インターネットを通じて web サイトからヒト遺伝子情報を獲得する事が出来る。また、今までの米国のアイオワ大学、ピッツバーグ大学等が行った大規模研究の結果を当施設での遺伝子解析に応用することによって原因遺伝子の推定、人種間での比較、未知の原因遺伝子の発見等が期待できた。

<実験方法>

連鎖解析 (Linkage analysis) を用いた研究は多く報告され、疾患と特異的に相関のある染色体部位を推定している。さらに共同研究施設であるアイオワ大学およびピッツバーグ大学では、全ゲノム領域に対してパラメトリック、ノンパラメトリック解析を行い多数の遺伝子座を推定した。私はこれらの詳細を早期に知る事ができ、これらの情報をもとに以下の実験を行った。まず血液サンプルから DNA を抽出し、PCR (polymerase chain reaction) を利用した PCR-direct sequence 法により遺伝子及び近傍の塩基配列を解読した。これにより遺伝子におけるアミノ酸変異が特定し、また近傍の領域では遺伝子発現調節領域における変異を解読することにより量的変化が疾患の原因となりえる可能性を推定した。遺伝子変異の箇所、予想した機

能変化については、Case-control study 及び連鎖不平衡解析である TDT analysis を用いて一塩基変異の頻度を比較した事により遺伝子の特定および遺伝形式の確定を行った。また、発現頻度が rare な遺伝子変異については全ての家族サンプルも解析した。モンゴル人、日本人サンプルのみならず、アメリカ人、中国人、スペイン人、フィリピン人サンプルについても解析した。

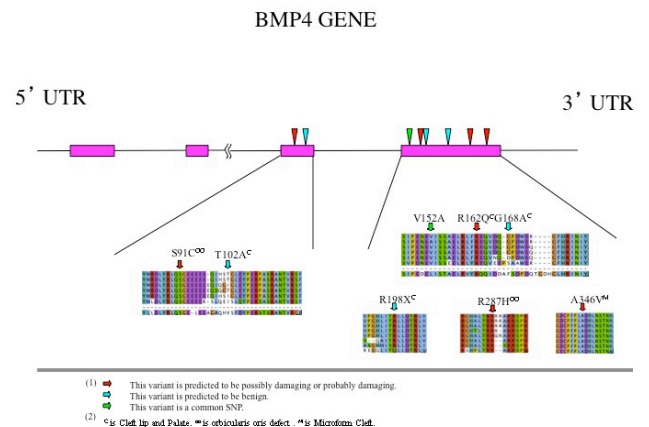
また、さらに共同研究施設である Iowa 大学および Pittubergh 大学では、全ゲノム領域に対してパラメトリック、ノンパラメトリック解析を行い多数の遺伝子座を推定した。2010年には全ゲノム解析用 chip を使用した全ゲノム関連解析の結果（ヨーロッパ系白人種（主にノルウェー人、デンマーク人）およびアジア系種（主にフィリピン人）について私はこれらの詳細を早期に知る事ができたので、これらの情報を基に日本人およびモンゴル人サンプルを使用して解析した。解析には主に SNP 頻度について家系解析である TDT 解析を行うとともに遺伝形式の違いによるリスク検定もおこなった。解析用ソフトウェアは FBAT と PLINK を使用した。また、Case-control 実験のために、mutation search も行った。

4. 研究成果

口唇口蓋裂は先天異常の中でも最も高い発現頻度でみられる外表奇形であり、その発現頻度は 0.015% である。また発生頻度において、地域または人種により発現頻度が異なることは古くから知られている。日本人と遺伝的に類似点の多いモンゴル人の口唇口蓋裂ならびにそれに関連する先天異常について病因を解析することである。

初年度においては、米国アイオワ大学およびピッツバーグ大学で得られた口唇口蓋裂患者サンプルの連鎖解析の結果から、TGFb 遺伝子スーパーファミリーのひとつである BMP4 遺伝子の解析を行った。解析方法は PCR-Direct Sequenceにて一塩基多型（SNP）を含む遺伝子変異を検出、確認した。また国際 HapMap プロジェクトより BMP4 遺伝子を含む領域について SNP マーカーを設定し、TDT 解析を行った。解析に使用したサンプルはモンゴル人、グアテマラ人、ヨーロッパ系白色アメリカ人、ヨーロッパ系白人、コロンビア人、

フィリピン人の口唇口蓋裂患者及び関連疾患（微小型口唇裂；Microform cleft）その家族とコントロールサンプルである。合計 1614 人の遺伝子を確認し、疾患群においてのみ 7 種類 8 個の新規の BMP4 遺伝子変異を発見（S91C, T102A, R162Q, G168A, R198X, R287H, A346V）した。これらの結果について Fisher exact 検定を行い、有意差 $p=0.006$ をもって有意であった。このことから BMP4 遺伝子が原因遺伝子の一つであることが強く示唆された。



Amino Acid Change	Comparative Amino Acid alignment	Phenotype	Predicted effect
S91C		Orbicularis Oris Muscle Defect	Damaging
T102A		Cleft Lip and Palate	Benign
R162Q		Cleft Lip and Palate	Damaging
G168A		Cleft Lip and Palate	Benign

Amino Acid Change	Comparative Amino Acid Alignment	Phenotype	Predicted effect
R198X		Cleft Lip and Palate	Damaging
R287H		Orbicularis Oris Muscle Defect	Damaging
A346V		Microform Cleft	Damaging

Comparative amino acid alignment follow the order of Homo sapiens (Human), Pan troglodytes (Chimpanzee), Bos taurus (Cow), Rattus norvegicus (Rat), Canis familiaris (Dog), Gallus gallus (chicken), Xenopus tropicalis(Frog), Danio rerio (Zebrafish).

口唇口蓋裂は遺伝因子の1つである IRF6 遺伝子解析において、その遺伝子の5末端側に存在する多型部位の一つである AP-2a (activating enhancer binding protein 2 alpha) 蛋白結合部位の一塩基変異 (SNP) が口唇裂発生に深く関与していることが近年示唆された。米国アイオワ大学 Jeffrey C. Murray 教授が以前報告した連鎖解析においてもこの AP-2a 遺伝子を含む領域が連鎖している。またマウスモデル実験においてもこの AP-2a 遺伝子は頭頸部領域に強く発現しており、遺伝子欠失マウスでは顔面を含む多発奇形を発生させることが確認されている。また近年この AP-2a 遺伝子変異が原因である疾患、branchio-oculo-facial syndrome が報告されている。我々はこの AP-2a 遺伝子の内部もしくは近傍に存在する8つの SNP をモンゴル人175家系、アメリカ人、フィリピン人の口唇口蓋裂患者および両親について TaqMan 法にて genotyping し、得られたデータはすべてハーディ・ワインベルク平衡を検定した後に解析した。多型解析には TDT 解析である Family Based Association Test (FBAT) を使用した。解析結果において、AP-2a 遺伝子内部の多型 (rs1675414) が有意差 (P 値 < 0.001) ありと判定された。これらの事により、AP-2a 遺伝子多型の直接的な関与を示し、口唇口蓋裂発生における AP-2a 遺伝子に関わる遺伝子多型が深く関与していることが疑われた。

最終年度においては、人種間での共通遺伝因子および差異を解析するために全ゲノム解析に注目した。最近の全ゲノム遺伝子解析が米国アイオワ大学 Jeffrey C. Murray 教授および米国ジョンホプキンス大学 Terri Beaty により報告され、アメリカ人、フィリピン人等において MAFB、VAX1、PAX7 等の幾つかの遺伝子座が新たに口唇口蓋裂の候補遺伝子領域として発見された。この度、この結果が関連しているかどうかを確認する為に独立した症例を使用した。モンゴル人サンプルを使用した Case-Control Study において有意差が確認できたため、二次解析としてモンゴル人204家系、日本人98家系を使用した。遺伝子解析においては、MAFB、VAX1、PAX7 遺伝子の近傍もしくは内部に存在する一塩基変異 (SNP) についてタックマンアッセイを用いて行った。連鎖不平衡解析および多型解析には TDT 解析である FBAT と

PLINK を使用した。モンゴル人家系において、いくつかの有意差がみられた (VAX1, rs7078160, $p=5.32E^{-05}$, and MAFB, rs13041247, $p=0.00108$) 日本人家系においても有意差が認められた (VAX1, rs7078160, $p=0.00511$) これらの事により、MAFB、VAX1 遺伝子多型の直接的もしくは間接的な関与が口唇口蓋裂発生に深く関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, Natsume N, Shimozato K, Ohbayashi N, Suzuki Y, Niimi T, Minami K, Yamamoto M, Altannamar TJ, Erkhembaatar T, Furukawa H, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Brandon CA, Weinberg SM, Neiswanger K, Deleyiannis FW, de Salamanca JE, Vieira AR, Lidral AC, Martin JF, Murray JC. Mutations in BMP4 Are Associated with Subepithelial, Microform, and Overt Cleft Lip, *The American Journal of Human Genetics*, 84(3):406-11, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- ① Satoshi Suzuki, TFAP2A is associated with nonsyndromic Cleft Lip and Palate, *American society of human genetics*, 2009.10.18-2009.10.25, Hawaii waikiki
- ② Satoshi Suzuki, Replication of genome wide association findings for Cleft Lip and Palate a role for variants in MAFB, VAX1 and PAX7 in Asian population, *アメリカ人類遺伝学会総会* 2010.11.1-2010.11.6, ウォルターE. ワシントンコンベンションセンター (米国ワシントン DC)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 聡 (SUZUKI SATOSHI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：30468996